



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Hematologia

Púrpura trombocitopénica trombótica

Síndrome Hemolítica Urémica

E o Sistema de Complemento

Maria Manuel de Almeida Santos

MAIO'2018

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Hematologia

Púrpura trombocitopénica trombótica

Síndrome Hemolítica Urémica

E o Sistema de Complemento

Maria Manuel de Almeida Santos

Orientado por:

Dr.^a Graça Vasconcelos Esteves

MAIO'2018

1. RESUMO

A Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT) e a Síndrome Hemolítica-Urémica (SHU), são doenças caracterizadas por trombocitopenia, anemia hemolítica não imune e disfunção multiorgânica. Estas doenças são patologicamente indistinguíveis, contudo, foram identificados mecanismos que permitiram classificar estas síndromes com base molecular. Na PTT observa-se deficiência da enzima ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type I motif, member 13*), responsável pela clivagem do Fator de von Willebrand (FvW). Existem duas categorias de SHU: típica e atípica (SHUa). A SHU típica pode ser provocada por infecção com microorganismos produtores de shigatoxina (Stx), mais comumente, *Escherichia coli* (STEC-SHU). A SHUa, é causada por desregulação no sistema de complemento. Foram demonstradas mutações nos genes que codificam o fator H (CFH), fator I (CFI), fator B (CFB), fator C3 do complemento, proteína cofator de membrana (MCP) e trombomodulina (THBD) e autoanticorpos anti-CFH. Estas doenças, apesar de apresentarem etiologia distinta, apresentam um elo comum, o sistema de complemento. Na PTT, os multímeros de FvW de alto peso molecular, proporcionam superfícies de ativação da via alternativa. Contudo, os multímeros de baixo peso molecular favorecem a degradação de C3b pelo CFI, o que favorece a hipótese de modulação da via alternativa pela ADAMTS13. Na STEC-SHU, a Stx aumenta a expressão de P-seletina, com elevada afinidade para C3, e interfere com a regulação da via alternativa, tendo como alvo a porção do CFH, que se liga à superfície celular, tornando as células vulneráveis ao ataque de complemento. Além disso, a Stx-2 ativa diretamente a fase fluida do complemento, embora o mecanismo permaneça desconhecido. O Eculizumab é um anticorpo monoclonal para C5, estando indicado para terapêutica na SHUa. O seu uso em alguns casos de PTT e STEC-SHU refratários demonstrou resultados promissores. É necessária investigação adicional nesta área, que poderá ser uma nova opção para estas doenças.

Palavras chave: Púrpura Trombocitopénica Trombótica; Síndrome Hemolítica Urémica, Shigatoxina, complemento; Eculizumab.

2. ABSTRACT

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS), are diseases characterized by thrombocytopenia, nonimmune hemolytic anemia and multiorgan dysfunction. These diseases are pathologically indistinguishable, however, mechanisms, which enabled classification of these syndromes on a molecular basis, were

identified. In TTP there is deficiency of the enzyme ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif, member 13), responsible for the cleavage of von Willebrand factor (vWF). There are two categories of HUS: typical and atypical (aHUS). Typical HUS can be caused by infection with microorganisms producing shiga toxin (Stx), most commonly, *Escherichia coli* (STEC-HUS). aHUS is caused by dysregulation of the complement system. Mutations in the genes encoding factor H (CFH), factor I (CFI), factor B (CFB), C3 complement factor, membrane cofactor protein (MCP) and thrombomodulin (THBD) and anti-CFH autoantibodies, have been demonstrated. These diseases despite having different etiology, have a common bond, the complement system. In TTP, vWF ultralarge multimers provide alternative pathway activation surfaces. However, smaller vWF multimers favor the degradation of C3b by CFI, which supports the hypothesis that ADAMTS13 plays a role in modulating the alternative complement pathway. In STEC-HUS, Stx increases the expression of P-selectin, with high affinity to C3, and interfere with regulation of the alternative pathway, targeting the membrane-binding portion of CFH, making cells vulnerable to complement attack. Furthermore, Stx-2 directly activates complement in fluid phase, although the mechanism remains unknown. Eculizumab is a monoclonal antibody indicated for treatment in aHUS. It was used in some cases of TTP and STEC-HUS refractory to conventional treatment, and has gained promising results. Additional trials are necessary in this area, which may become a new option for these diseases.

Keywords: Thrombotic thrombocytopenic purpura; Hemolytic Uremic Syndrome; Shigatoxin; complement; Eculizumab.

ÍNDICE

1. Resumo	3
2. Abstract.....	3
3. Introdução	6
4. Sistema de complemento	7
5. PTT	8
6. SHU	12
6.1. STEC-SHU	12
6.2. SHUa.....	15
7. Eculizumab, PTT e SHU	21
8. Conclusão	22
9. Agradecimentos	23
10. Bibliografia.....	24

3. INTRODUÇÃO

Microangiopatia trombótica (MAT) é o termo designado para doenças, nas quais microtrombos disseminados, compostos por plaquetas aglutinadas, ocluem arteríolas e capilares. A Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT) e a Síndrome Hemolítica Urémica (SHU) são as duas principais doenças associadas com MAT (1), caracterizadas por trombocitopénia, anemia hemolítica não imune e disfunção multiorgânica. A trombocitopénia reflete um consumo excessivo plaquetário resultante da formação de trombos na microcirculação de vários órgãos, incluindo os rins, cérebro, coração, pulmão e sistema gastrointestinal (2,3). A anemia resulta da fragmentação eritrocitária no lúmen dos vasos obstruídos pelos trombos plaquetários (2). Estas doenças são patologicamente indistinguíveis, e no passado o diagnóstico diferencial de PTT e SHU baseava-se na localização preferencial de lesões, com maior prevalência no cérebro ou nos rins, respetivamente. Contudo, a SHU pode apresentar manifestações extra-renais e os doentes com PTT podem apresentar doença renal severa, sendo difícil diferenciá-las somente com base clínica. No entanto, foram identificados mecanismos fisiopatológicos que permitiram classificar estas síndromes com base molecular (2). A PTT é também denominada síndrome de Moschowitz (4). A sua etiologia deriva de deficiência na metaloprotease ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type I motif, member 13*), responsável pela degradação dos multímeros do Fator de von Willebrand (FvW) (5). A PTT pode ser congénita, resultando de mutações no gene da enzima, ou adquirida, pelo desenvolvimento de autoanticorpos anti-ADAMTS13 (1,2). A SHU é composta por duas categorias: típica e atípica. A SHU típica é geralmente precedida por um episódio de diarreia, derivado de infeção com microorganismos produtores de shigatoxina (6), comumente a *Escherichia coli* (STEC-SHU) (2). A SHU atípica é familiar ou esporádica (6), relacionando-se com desregulação no sistema de complemento (2). Foram identificadas mutações nos genes que codificam o fator H (CFH), fator I (CFI), fator B (CFB), fator C3, proteína cofator de membrana (MCP) e trombomodulina (THBD) e estão descritos autoanticorpos anti-CFH (7). Apesar de apresentarem etiologias distintas, foi proposto que a ativação do sistema de complemento é um mecanismo patogénico comum a PTT, STEC-SHU e SHUa (2). O objetivo desta revisão é avaliar o conhecimento atual a nível fisiopatológico destas três entidades e enquadrar o sistema de complemento como elo comum.

4. SISTEMA DE COMPLEMENTO

Existem vários mecanismos de defesa no ser humano para proteger de microorganismos patogênicos, e o sistema de complemento é um elemento chave da imunidade inata, que auxilia no seu rápido reconhecimento e eliminação. O sistema de complemento é constituído por mais de 30 proteínas, a maioria sintetizadas no fígado e distribuídas no plasma e superfícies celulares (7). As funções primárias deste sistema consistem em iniciar e mediar reações inflamatórias, participar na clearance de produtos de degradação endógenos, marcar microorganismos patogênicos para opsonização e eliminar microorganismos com o complexo de ataque à membrana (MAC) (3). O sistema de complemento é ativado por três vias: clássica, lectina e alternativa. Estas três vias convergem na clivagem do fator C3 do complemento. A ativação da via clássica e lectina ocorre após ligação a complexos imunes ou microorganismos, respetivamente (8), originando a clivagem sequencial dos fatores C2 e C4 do complemento e formação de C4bC2a, designada C3 convertase, que cliva C3 em C3a e C3b (7). A via alternativa encontra-se constitutivamente ativada com formação de C3 em C3b. Numa superfície estranha, como uma bactéria, o C3b liga-se ao CFB, o qual é clivado pelo fator D, formando a C3 convertase, C3bBb. Esta convertase produz uma clivagem exponencial de C3 (*loop* de amplificação) (8). A associação de C3b e C4bC2a ou C3bBb, resulta na formação da enzima C5 convertase, que cliva o fator C5 em C5a e C5b (2). O fator C5b inicia a via terminal do complemento, através da união com os componentes C6-C9, culminando na formação do complexo lítico C5b-C9 (MAC) nas superfícies alvo (2). Os fatores ativados do complemento C3a e C5a são anafilatoxinas solúveis que estão envolvidas na quimiotaxia e ativação de neutrófilos, monócitos e macrófagos, os quais contribuem para a lesão endotelial (2).

As moléculas de C3b podem ligar-se à superfície de patógenos e células do hospedeiro. No sentido de evitar dano nas células hospedeiras, existem proteínas reguladoras, ancoradas na membrana, tais como MCP, CD55, CD59 e THBD, ou plasmáticas, tal como CFH. Estas proteínas reguladoras favorecem a clivagem de C3b em C3b inativo (iC3b) pelo CFI (atividade de cofator), dissociam a C3 convertase e C5 convertase (atividade de aceleração do decaimento) ou previnem a união de C9 no complexo C5b-9 (9). (Figura 1)

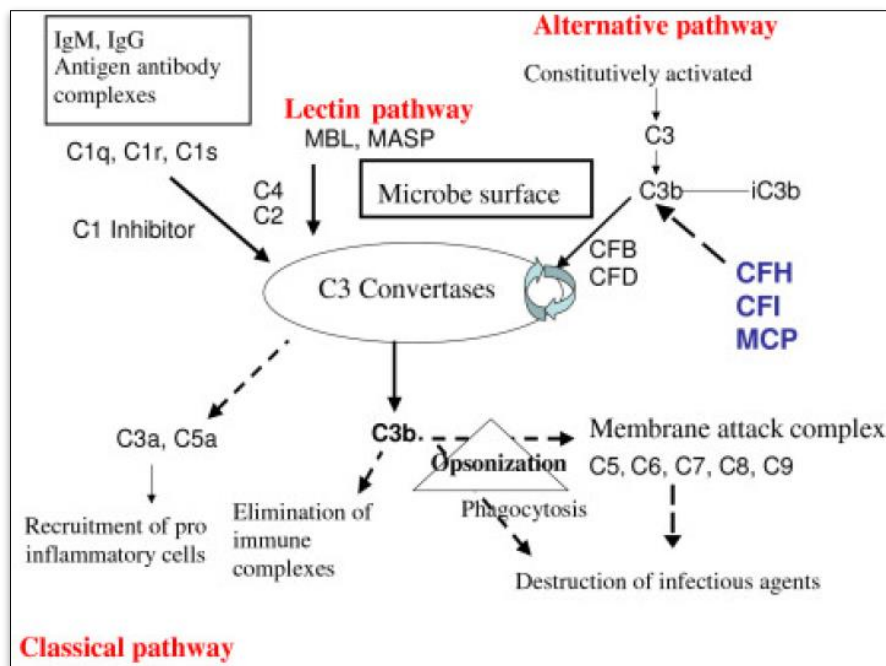


Figura 1. As três vias da ativação do complemento. As vias clássica, lectina e alternativa convergem no ponto de ativação de C3. A via lítica origina a formação de MAC, que destrói os agentes infecciosos. Os reguladores da via alternativa CFH, CFI e MCP cooperam na inativação de C3b ligado à superfície endotelial, protegendo as células endoteliais do ataque do complemento. Adaptado de (8).

5. PTT

5.1. Descrição Clínica

A PTT adquirida é a forma mais comum (5), com cerca de 95% de casos (10). Ocorre com maior frequência em adultos (11), com ligeira predominância feminina (3:2), e pico de incidência na 4ª década de vida (12). No entanto, foram registados casos em crianças com idade inferior a 2 anos e contrariamente ao observado na idade adulta, verifica-se uma maior prevalência no sexo masculino (13). Esta doença foi originalmente caracterizada por uma pêntade constituída por trombocitopénia, anemia hemolítica microangiopática, sinais neurológicos flutuantes, disfunção renal e febre (12) (5). Os sinais neurológicos têm múltiplas apresentações, incluindo cefaleias, vertigem, confusão, convulsões ou níveis flutuantes de consciência, inclusive coma (1,5). A insuficiência renal aguda com necessidade de hemodiálise é rara na PTT (5). Os doentes caracteristicamente apresentam hematúria e proteinúria, sem alterações na clearance renal (14). No entanto, 35% dos doentes não têm sinais neurológicos, disfunção renal ou febre. Podem ser observadas complicações isquémicas a nível gastrointestinal (5), ou cardíaco (10). Muitos doentes descrevem sintomas inespecíficos, como fadiga, mal-estar ou infeção respiratória nos dias ou semanas precedentes (12). Outros doentes permanecem

assintomáticos, têm trombocitopénia isolada ou apresentam-se com acidente isquémico transitório ou acidente vascular cerebral (AVC), sem alterações hematológicas (14). A trombocitopénia pode causar equimoses, petéquias, menorragia, epistáxis e hemorragia gastrointestinal (10).

A atividade residual da enzima ADAMTS13 encontra-se associada a exacerbação (reaparecimento da doença num intervalo de tempo inferior a 30 dias, após aparente resolução clínica) e a recorrência (reaparecimento da doença depois de 30 dias após remissão clínica) (15). Os doentes com valores inferiores a 10% ou autoanticorpos anti-ADAMTS13 no período de remissão, apresentam risco três vezes superior de recorrência durante o primeiro ano (5). Contudo, foram registados casos de doentes com autoanticorpos e atividade residual severamente diminuída, que se mantiveram em remissão durante anos (15).

A forma congénita de PTT, também denominada síndrome de Upshaw-Schulman, é rara, registando 2-4% de casos de PTT (11). É uma doença autossómica recessiva (4), o que indicaria não haver preferência no sexo afetado, no entanto, verifica-se uma predominância no sexo feminino (13). Apresenta um fenótipo variável, podendo ocorrer em qualquer idade (5), relacionando-se com o nível de atividade residual da enzima ADAMTS13. Os níveis baixos desta enzima, inferior a 3%, estão associados com início precoce de PTT e um maior número de recaídas (11,15,16). Existem exceções, sendo observados doentes com elevada atividade residual e início precoce da doença ou recorrências frequentes (16). Os recém-nascidos frequentemente têm icterícia severa e presença de esquizócitos no esfregaço de sangue periférico. Na infância o diagnóstico é efetuado tipicamente por trombocitopénia, anemia hemolítica microangiopática, icterícia e lactato desidrogenase elevada, contudo, em alguns casos, verifica-se trombocitopénia isolada. Sintomas neurológicos como hemiparésia, hemiplegia ou convulsões ocorrem em 35% dos casos. A PTT pode manifestar-se somente na idade adulta, e em casos raros tardiamente, aos 50 a 60 anos de idade, apresentando-se com eventos cerebrais ou renais isolados (5). Os indivíduos heterozigóticos, para um único alelo (17), apresentam atividade de ADAMTS13 a 40-70% da normalidade. Não foram atribuídas anormalidades fenotípicas na deficiência parcial da enzima (14), sendo geralmente assintomáticos (17).

5.2. Fisiopatologia

A PTT adquirida é uma doença autoimune, caracterizada por autoanticorpos inibitórios anti-ADAMTS13 (17), predominantemente a imunoglobulina da classe G (IgG) (18) e

menos frequentemente IgM e IgA (14,17), presente em 70% dos casos (18). A inibição da enzima ADAMTS13 não é o único mecanismo responsável pela sua deficiência. Foram identificados autoanticorpos com insuficiente ou ausente capacidade inibitória, e níveis de antígeno da enzima baixos em doentes com PTT. O mecanismo proposto envolve depleção da enzima, por aumento de clearance, devido a autoanticorpos não inibitórios (18,19), presente em 30% de casos (18).

Na PTT congénita estão descritas mais de 150 mutações, heterozigóticas compostas, cerca de 75% dos casos, ou homozigóticas (10,20), no gene que codifica esta enzima (11), localizado no cromossoma 9q34 (4,21). A maioria das mutações analisadas causa deficiência severa de ADAMTS13, devido a síntese inadequada, com retenção intracelular da enzima. Os doentes exibem diminuição nos níveis de antígeno e na atividade da enzima (17).

A enzima ADAMTS13 é uma metaloprotease produzida primariamente no fígado pelas células estreladas. É expressa em menores quantidades noutras células, tais como os podócitos renais e células tubulares, células endoteliais, megacariócitos e plaquetas (14). O FvW é uma glicoproteína multimérica, sintetizada e armazenada pelas células endoteliais e megacariócitos. (4) O papel fisiológico deste fator inclui a adesão plaquetária no endotélio lesado e participação no processo de agregação para formar o trombo plaquetário (4,14). A exocitose dos multímeros de FvW pode ser de forma constitutiva (17) ou em resposta a diversos estímulos endógenos, tais como interleucina-8 (IL-8), IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α) (4), histamina, trombina, fibrina ou desmopressina exógena (13,14).

Os multímeros de FvW ao serem libertados para a circulação adotam uma forma globular. Em situações de lesão endotelial verifica-se uma alteração conformacional para uma forma alongada com elevada afinidade plaquetária, permitindo a constituição de trombos fisiológicos. Na microcirculação, em condições de elevado *stress* de cisalhamento (17), nas arteríolas e capilares (10), os multímeros de FvW alteram a forma globular para uma conformação alongada, o que origina a formação de trombos na ausência de lesão endotelial (17). Para evitar a formação de trombos não fisiológicos os multímeros de FvW de alto peso molecular são clivados pela enzima ADAMTS13 (17). (Figura 2)

A deficiência de ADAMTS13 não significa ocorrência de doença, corresponde a um importante fator de risco, mas não é pré-requisito para desenvolver PTT (12). Os doentes podem permanecer assintomáticos até ocorrer um evento precipitante, nos quais se incluem gravidez, cirurgia, trauma, febre ou infeção (14). Estes eventos ativam as células

endoteliais, causando secreção de multímeros de FvW de alto peso molecular (2), excedendo a capacidade de clivagem da enzima ADAMTS13 (4,21).

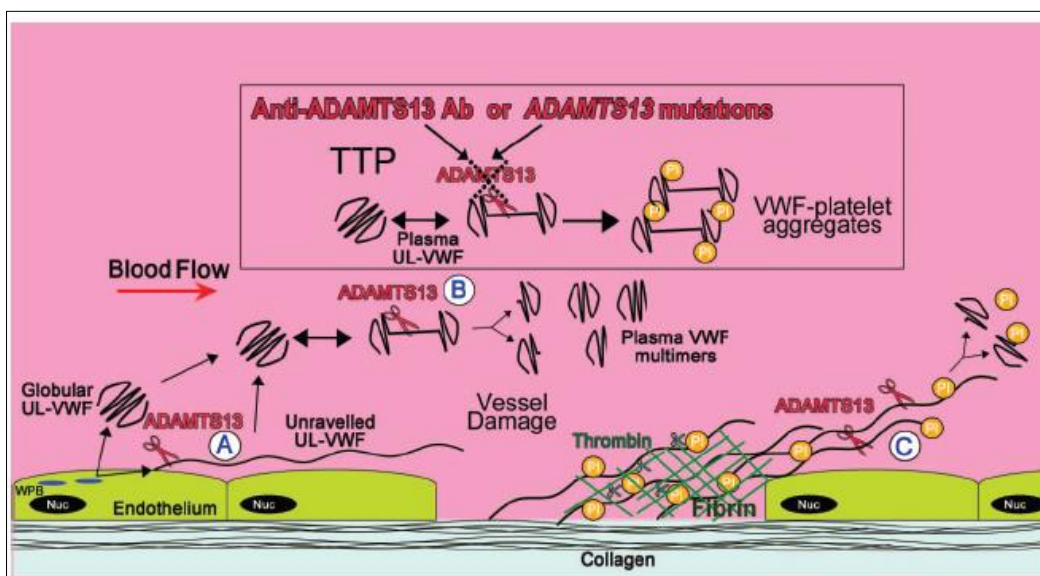


Figura 2. Localização da clivagem do FvW pela ADAMTS13 e a sua deficiência na PTT. Os multímeros de FvW de alto peso molecular são sintetizados pelo endotélio e armazenados nos corpos de Weibel Palade (WPB). Os multímeros de FvW de variados tamanhos, incluindo de alto peso molecular, podem ser secretados diretamente na circulação. (A) Alternativamente, uma proporção de multímeros de alto peso molecular pode ligar-se à superfície endotelial durante a secreção e adotar uma conformação alongada em resposta a *stress* de cisalhamento. Nestas circunstâncias o domínio A2 do FvW torna-se acessível à clivagem pela ADAMTS13. O FvW adota uma conformação globular no plasma. Contudo, durante a passagem pela microcirculação, o FvW globular, pode adotar parcialmente/temporariamente uma conformação alongada. (B) Isto permite o processamento de formas hemostaticamente ativas de FvW, resultando na sua conversão em multímeros de menores dimensões. Nos locais de lesão endotelial existe exposição do colagénio subendotelial, com ligação de FvW plasmático, que adota uma conformação alongada e recruta plaquetas. A presença de colagénio e trombina induz rápida ativação plaquetária, a qual juntamente com fibrina, consolida o trombo plaquetário. (C) A jusante da lesão endotelial (ausência de colagénio e trombina), os agregados de FvW e plaquetas podem ser sujeitos a proteólise pela ADAMTS13, que limita a formação do trombo plaquetário. A deficiência de ADAMTS13, seja através de autoanticorpos ou congénita, resulta na perda de processamento de FvW. Nesta circunstância, as plaquetas podem ligar-se a multímeros de FvW de conformação alongada, originando acumulação de agregados de plaquetas e FvW que ocluem a microcirculação. Adaptado de (17).

5.3. PTT e ativação do Sistema de Complemento

A evidência *in vivo* da ativação do complemento na PTT teve início em 1977, quando a deposição de C3 foi demonstrada nos capilares e arteríolas duma jovem mulher. Em estudos subsequentes, quatro de doze doentes apresentaram plaquetas associadas a C3, e numa série de casos com MAT familiar, 73% de casos tinham níveis reduzidos de C3, independentemente de estarem classificados como PTT ou SHU. Nestes estudos o diagnóstico de PTT foi feito com base em parâmetros clínicos, não sendo avaliada a

ADAMTS13. Mais recentemente, outros estudos investigaram os marcadores de ativação de complemento em doentes com PTT e deficiência severa (<5%) de ADAMTS13. Ruiz-Torres *et al.* estudou quatro doentes com PTT congénita e quatro doentes com PTT adquirida, com deficiência severa de ADAMTS13. Dois doentes em cada subgrupo demonstraram baixos níveis de C3 no soro, durante a fase aguda da doença. Foi também demonstrado que o soro de doentes com PTT causou deposição de C3 e C5b-C9 nas células endoteliais, não sendo observada diferença na deposição de C4 entre doentes com PTT e controlos, o que indica ativação seletiva da via alternativa. Reti *et al.* mediram os marcadores de ativação do complemento no soro ou plasma de treze doentes com PTT, por deficiência adquirida de ADAMTS13. Os níveis plasmáticos de C3a e C5b-9 solúvel (sC5b-9), estavam mais elevados nos doentes com PTT aguda, em relação com os controlos. Foi verificado que os níveis de C3 e C5b-C9 correlacionam-se com a atividade da doença, normalizando na remissão (2). Em doentes com PTT foi relatada maior mortalidade relacionada com aumento na ativação do complemento (22).

O início da via alternativa do complemento requer uma superfície, para clivagem e ativação de C3 em C3b. Evidências sugerem que os multímeros de FvW de alto peso molecular proporcionam extensas superfícies para a ativação desta via. Foram encontrados nos multímeros de FvW de alto peso molecular fatores ativados do complemento tais como C3b, Bb e C5b (23, 24). O fator C3b liga-se aos multímeros de FvW de alto peso molecular e promove a formação de C3 convertase e C5 convertase. No entanto, o fator C4 não se liga à superfície dos multímeros, demonstrando que a via clássica e a via da lectina não são ativadas por este mecanismo (23). Os multímeros de baixo peso molecular favorecem a degradação de C3b pelo CFI, enquanto que multímeros com elevado peso molecular não têm esse efeito, o que favorece a hipótese de modulação da via alternativa pela ADAMTS13 (24, 25). As anafilatoxinas C3a e C5a estão envolvidas na libertação de histamina dos mastócitos, aumentando a libertação de multímeros de FvW de alto peso molecular, o que permite a contínua deposição de complemento (26).

6. SHU

6.1. STEC-SHU

6.1.1. Descrição Clínica

A STEC-SHU é responsável por 90% de casos de SHU na infância. A incidência ronda 2-3/100000 crianças. É mais comum entre os 5 e 6 anos de idade, sendo observada

frequentemente nos meses de verão e áreas rurais. Ocorre após um episódio de gastroenterite aguda, que se desenvolve por infecção com *Escherichia coli* (*E. coli*) enterohemorrágica, produtora de shigatoxina (STEC). O serótipo mais comum é *E. coli* O157:H7 (28), podendo ser identificadas outras estirpes como O104:H4 que causou uma epidemia, perto de Bordeaux, na França, em junho de 2011, e um surto na Alemanha. Cerca de 5% de casos relacionam-se com outros patogêneos tais como *Shigella dysenteriae* tipo I ou *Streptococcus pneumoniae* (6). A infecção por STEC transmite-se por ingestão de alimentos e água contaminados, diretamente duma pessoa para outra ou ocasionalmente por exposição ocupacional. É responsável por um espectro de manifestações clínicas, desde portadores assintomáticos, presença de diarreia não hemorrágica, colite hemorrágica e morte. O intervalo médio entre a ingestão de STEC e doença é aproximadamente três dias, podendo variar entre dois e doze dias. A doença inicia-se tipicamente por dor abdominal severa e diarreia não hemorrágica, que se torna hemorrágica em 70% de casos, usualmente entre dois a três dias. Os vômitos ocorrem em 30 a 60% de casos e febre é reportada em 30% de doentes durante a fase inicial da doença. A percentagem de casos que progridem para SHU varia entre 3 a 9% em casos esporádicos e 20% durante surtos. Cerca de 70% de doentes requerem transfusões sanguíneas, e 40 a 50% precisam de hemodiálise com duração de aproximadamente dez dias, enquanto que os restantes casos apresentam pouco envolvimento renal. As manifestações extra-renais são uma importante causa de morbilidade e a principal causa de morte. As perturbações do sistema nervoso central são comuns e usualmente aparecem precocemente no curso da doença, com 25% de doentes com envolvimento neurológico, incluindo AVC, convulsões e coma. Uma complicação rara é o envolvimento pancreático que pode originar diabetes mellitus, aparecendo uma semana ou mais, após o início da SHU. Cardiomiopatia e miocardite podem ocorrer várias semanas após o início da doença, podendo ser ou não, secundárias a hipertensão ou sobrecarga de volume (9). Nos países desenvolvidos a mortalidade é inferior a 5% (6). Mais de 90% de casos em crianças recuperam completamente (9). No entanto, é uma causa frequente de insuficiência renal nas crianças. Quatro anos após um episódio, 3% das crianças desenvolvem insuficiência renal terminal (IRT) e 25% apresentam função renal reduzida (6).

6.1.2. Fisiopatologia

Após a ingestão de alimentos ou água contaminados, a STEC coloniza a mucosa intestinal e adere às células epiteliais, sintetizando e libertando shigatoxina (Stx). Presume-se que

a Stx alcança o rim e outros órgãos alvo após translocação do epitélio intestinal. Até ao momento não foi detetada Stx livre no plasma, contudo, foi demonstrada a sua ligação a neutrófilos. Outras células sanguíneas circulantes, tais como eritrócitos, plaquetas e monócitos, foram sugeridas como transportadoras de Stx. Existem dois tipos de Stx, Stx-1 e Stx-2. Estas toxinas causam diferentes graus de dano tecidual, documentado pela maior patogenicidade de estirpes de *E. coli* que só produzem Stx-2, em contrapartida com estirpes que só produzem Stx-1. Num estudo com crianças que foram infetadas com STEC, as estirpes de *E. coli* que produziam Stx-2 foram comumente associadas com SHU, enquanto que estirpes de crianças com diarreia isolada ou assintomáticas, só produziam Stx-1. A ligação da Stx nas células alvo ocorre pelo recetor de superfície celular globotriaosilceramida (Gb3), expresso predominantemente no endotélio. A densidade do recetor Gb3 medeia a suscetibilidade do leito vascular à ação da Stx, sendo particularmente elevada no rim, assim como no cólon e cérebro (9). A Stx é internalizada por endocitose e bloqueia a síntese proteica causando morte celular por apoptose. O dano no endotélio renal expõe o subendotélio, juntamente com o fator tecidual (FT) e FvW, respetivamente envolvidos na coagulação e agregação plaquetária. Estes eventos originam microtrombose responsável por consumo plaquetário, destruição mecânica de eritrócitos e lesão renal aguda. A trombose e o dano tecidual são agravados pela isquémia e por citocinas pró-inflamatórias do endotélio lesado, atraindo neutrófilos, monócitos e macrófagos ativados, os quais libertam citocinas (NFκB, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8). As citocinas aumentam a expressam de Gb3 na superfície das células endoteliais, perpetuando a apoptose. Foi recentemente descoberto que a Stx pode interagir com o FvW, causando um atraso na clivagem pela ADAMTS13, promovendo uma nova explicação para a formação de trombos na STEC-SHU (9). (Figura 3)

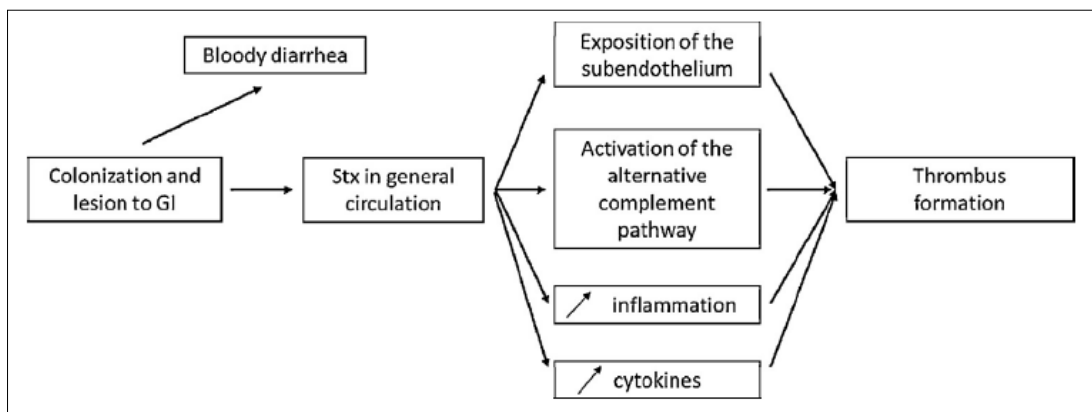


Figura 3. Etapas principais na fisiopatologia de SHU. Adaptado de (6).

6.1.3. STEC-SHU e ativação do Sistema de Complemento

Existem evidências que a ativação do sistema de complemento no endotélio renal, pode contribuir para a lesão microangiopática na STEC-SHU. Em 1970 foi observado que alguns doentes apresentavam níveis plasmáticos baixos de fator C3 do complemento. Em 1980 foram evidenciados níveis plasmáticos aumentados nos produtos de degradação da C3 convertase na via alternativa, C3b, C3c, C3d e Ba, em crianças com STEC-SHU. Mais recentemente, níveis plasmáticos elevados de Bb e sC5b-9, foram encontrados na fase aguda da STEC-SHU em dezassete crianças. Todos estes parâmetros normalizaram após a resolução da fase aguda. Resultados semelhantes foram obtidos num estudo sueco, numa coorte de dez crianças, os quais apresentaram níveis plasmáticos elevados de C3a e sC5b-9 e C3c, durante a fase aguda da doença. Os doentes deste estudo com oligúria demonstraram níveis mais elevados de fator Bb, em contrapartida com doentes não oligúricos. A deposição endotelial de complemento e perda de tromborresistência dependem do aumento na expressão de P-seletina, molécula de adesão membranar com elevada afinidade para C3, induzido pela Stx (9). Orth et al. apresentaram evidências que a Stx pode estar relacionada com desregulação na via alternativa do sistema de complemento. Foi demonstrado que a Stx se liga diretamente ao CFH e inibe a sua função protetora, tendo como alvo a porção do CFH que se liga à membrana celular, podendo o CFH ainda funcionar na fase fluída. Além disso, observou-se que a Stx-2 ativa diretamente a fase fluída do complemento *in vitro* (28). Este processo é concentração-dependente, ocorre predominantemente na via alternativa, não envolvendo degradação das proteínas reguladoras CFH ou CFI, permanecendo o mecanismo desconhecido (9). Recentemente demonstrou-se que a Stx reduz a expressão endotelial glomerular de CD59 e THBD (28,29). Estes dados sugerem que a Stx pode ativar o complemento e inibir a função e expressão de reguladores do sistema de complemento (28).

6.2. SHUa

6.2.1. Descrição Clínica

A SHUa é uma doença extremamente rara. A incidência anual é cerca de 2 casos por milhão de adultos e 3,3 casos por milhão em crianças. Esta doença ocorre em qualquer idade, desde o período neonatal até à idade adulta. O início durante a idade pediátrica (≤ 18 anos) parece ser mais frequente, com 60% de casos, em contrapartida com a idade adulta, com 40% de casos. 70% das crianças têm o primeiro episódio da doença antes dos dois anos de idade, e aproximadamente 25% das crianças antes dos 6 meses de idade.

Ambos os sexos são igualmente afetados na idade pediátrica. Na idade adulta existe preponderância do sexo feminino (9). Pode apresentar-se na forma esporádica ou familiar (30). A ocorrência familiar é observada em cerca de 20% de doentes (9). A forma familiar define-se como a presença de SHUa em pelo menos dois membros da mesma família. Aproximadamente 50% de formas familiares têm um padrão autossômico recessivo (20). Geralmente a doença tem início súbito. Os doentes exibem a tríade da SHU caracterizada por trombocitopenia, anemia hemolítica não imune e lesão renal aguda (9). As crianças apresentam palidez, fadiga, recusa alimentar, vômitos, sonolência e por vezes edema. Nos adultos as queixas envolvem fadiga e mal-estar geral (8). A hipertensão arterial é frequente e severa. Aproximadamente 20% de doentes têm um início progressivo com anemia subclínica e trombocitopenia intermitente, durante semanas ou meses, e função renal preservada na altura do diagnóstico. Outros doentes não têm anemia ou trombocitopenia e a única manifestação de MAT renal é hipertensão e proteinúria, com aumento progressivo da creatinina sérica. Apesar da MAT predominantemente afetar a microcirculação renal, a lesão pode envolver outros órgãos, tais como coração, intestino, pâncreas, pulmões e especialmente o cérebro, em cerca de 20% de doentes. Os sintomas extra-renais mais frequentes são neurológicos, com cerca de 10%, de casos, incluindo irritabilidade, sonolência, confusão, convulsões, encefalopatia, acidentes vasculares, hemiparesia, hemiplegia ou coma. O enfarte de miocárdio pode causar morte súbita, sendo observado em 3% de doentes, juntamente com cardiomiopatia e insuficiência cardíaca. Metade das crianças e a maioria dos adultos necessitam de hemodiálise na admissão. Após o primeiro episódio, a mortalidade é mais elevada nas crianças, no entanto, a progressão para IRT é mais frequente nos adultos (9).

6.2.2. Fisiopatologia

A maioria dos casos relacionados com SHUa ocorrem como resultado de mutações genéticas nos fatores do complemento, enquanto que 5-6% resultam de autoanticorpos produzidos contra as proteínas do complemento. O CFH, CFI, MCP ou CD46 e THBD, proteínas reguladoras da via alternativa do complemento, e o fator C3 e CFB, proteínas da C3 convertase, estão envolvidos na patogénese da SHUa. Mutações nos genes que codificam estas proteínas originam ativação descontrolada da via alternativa. A ativação do complemento provoca excesso de produção de MAC e C5a (31), com dano na superfície endotelial, exposição de matriz subendotelial e formação de trombos. Este fenómeno provoca consumo plaquetário e dano eritrocitário (8). (Figura 4)

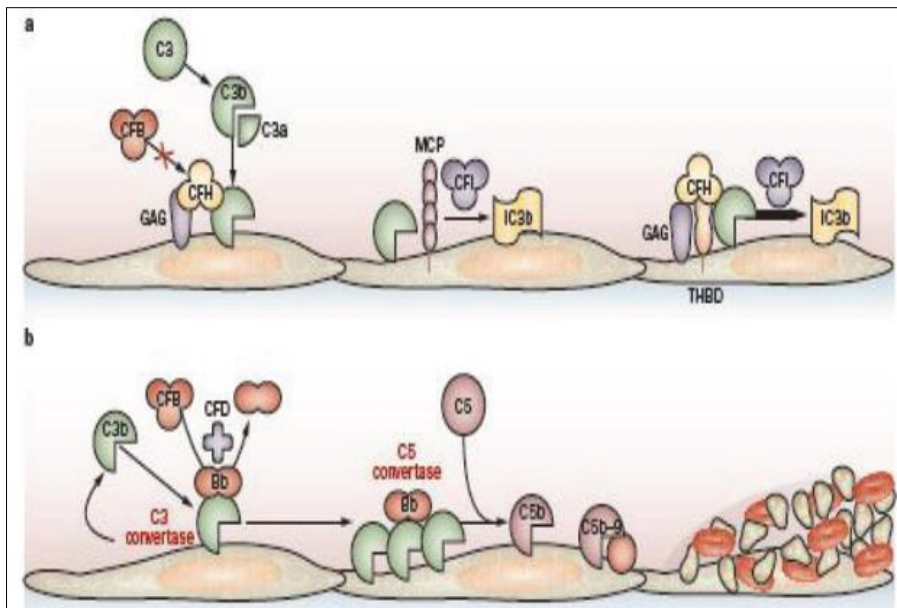


Figura 4. Ativação regulada e desregulada da via alternativa. a) CFH compete CFB na ligação a C3b, o que impede a formação de C3 convertase. CFH liga-se aos glicosaminoglicanos na superfície endotelial e fatores, tais como MCP, podem atuar como cofator na clivagem de C3b a iC3b, mediada por CFI. THBD liga-se a C3b e CFH e pode acelerar a inativação de C3b mediada por CFI. b) Ativação descontrolada da via alternativa origina a formação de MAC, através das ações de CFB, CFD e pela formação de C3 convertase e C5 convertase. A lesão resultante e ativação das células endoteliais inicia o processo trombótico microangiopático. Adaptado de (8).

CFH

O CFH é a proteína mais importante na regulação da via alternativa do complemento (8). Tem como funções atuar como cofator na inativação de C3b pelo CFI, competir com o CFB na ligação a C3b e acelerar o decaimento da C3 convertase (9). É constituído por 20 curtas repetições de consenso (SCR) e contém pelo menos dois locais de ligação a C3b. O primeiro local de ligação a C3b, que regula a fase fluída da via alternativa, localiza-se no N-terminal SCR1-4. O segundo local de ligação a C3b está situado no SCR19-20, no domínio C-terminal. O CFH também contém dois locais de ligação polianiónicos no SCR7 e SCR19-20. As células endoteliais são ricas em moléculas polianiónicas, como os glicosaminoglicanos. A proteção das células hospedeiras depende da inativação de C3b nas superfícies, secundária à ligação de CFH a C3b (8). (Figura 5)

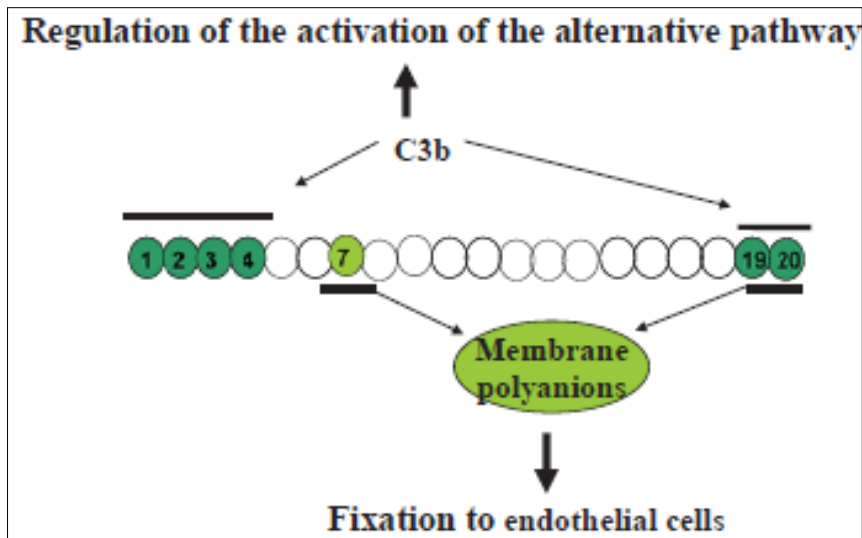


Figura 5. CFH. O CFH é constituído por 20 SCR. Os dois locais de ligação a C3b localizam-se no SCR1-4 e 19-20. Os locais de ligação polianiónicos para a superfície celular (endotélio vascular) estão no SCR7 e 19-20. SCR1-4 está envolvido na ligação de CFH a C3b circulante, ou seja, a regulação da via alternativa na fase fluída. SCR7 e 19-20 estão envolvidos na ligação de CFH a superfícies polianiónicas com C3b, ou seja, a regulação da via alternativa na superfície endotelial. Adaptado de (8).

As mutações no CFH são as mais frequentes na SHUa, com cerca de 20 a 30% de casos de SHUa (7). Mais de 50% das mutações localizam-se no SCR19-20 (9). Estas mutações reduzem a capacidade do CFH para se ligar ao C3b nas superfícies celulares, inibindo a degradação de C3b e C3 convertase. Cerca de 100 mutações foram descritas no CFH, e aproximadamente 75% são heterozigóticas (7). Algumas mutações, denominadas de tipo 1, estão associadas com défice quantitativo no CFH, com baixos níveis plasmáticos, no entanto, a maioria das mutações no SCR19-20, relacionam-se com níveis normais de CFH e deficiência funcional, denominada mutação de tipo 2 (8). Podem ser observados níveis baixos de C3 em cerca de 30% de doentes (7). Portanto, níveis normais plasmáticos de CFH ou C3 não excluem a possibilidade de mutação. Os doentes com esta mutação apresentam o pior prognóstico, com mortalidade ou progressão para IRT em 50-70% de casos durante o primeiro ano (27).

MCP

As mutações na MCP estão presentes em 10-15% de doentes, estando descritas mais de 40 mutações. É uma glicoproteína transmembranar, que previne a ativação de C3 nas células hospedeiras, servindo como cofator de CFI. A maioria das mutações são heterozigóticas, causando diminuição na atividade de MCP. Estas mutações estão associadas com expressão reduzida de MCP nos leucócitos em 70% de casos (7), sendo

um importante teste diagnóstico (8). Em cerca de 30% de doentes os níveis plasmáticos de C3 estão diminuídos (7). Em relação a doença renal é a mutação com melhor prognóstico. O risco de recorrência após transplante renal é baixo (27).

CFI

As mutações no CFI englobam 5-10% de doentes. Foram descritas cerca de 40 mutações, na sua maioria heterozigóticas. As mutações no CFI originam diminuição na atividade ou concentração plasmática, inibindo a degradação de C3b. As concentrações plasmáticas de C3 e CFI estão diminuídas em aproximadamente 30% de doentes (7). A progressão para IRT ocorre em 50-60% de casos nos primeiros dois anos (27).

THBD

A THBD é um cofator, possibilitando a inativação de C3b pelo CFI. As mutações na THBD encontram-se em 3-5% de casos. Os níveis de C3 estão diminuídos em aproximadamente 60% de doentes (27).

C3

As mutações em C3 ocorrem em 2-10% de doentes, sendo usualmente heterozigóticas. A maioria das mutações correspondem a ganho de função (7), com diminuição na capacidade de ligação a C3b, das proteínas reguladoras, ou aumento de afinidade na ligação a CFB e consequente aumento na formação de C3 convertase (9). Em aproximadamente 80% dos doentes os níveis de C3 estão diminuídos (7). Cerca de 60-80% dos doentes progridem para IRT. A recorrência após transplante renal é de 40-70% (27).

CFB

As mutações no CFB estão presentes em 1-4% de casos. As mutações envolvem ganho de função com aumento na afinidade da ligação a C3b, estabilizando a C3 convertase, tornando-se resistente a degradação. Os doentes com mutação no CFB têm sempre níveis baixos de C3 devido a contínua ativação da via alternativa do complemento (7). 70% de doentes desenvolvem IRT. A recorrência após transplante renal foi observada em todos os doentes (27).

Autoanticorpos anti-CFH

Em 2005, foi descrito em doentes com SHUa, um defeito adquirido no CFH, devido a autoanticorpos IgG anti-CFH (9). O IgG anti-CFH liga-se a SCR19 e 20, inibindo a ligação a C3b e à superfície celular (8). Estes casos englobam 5-10% de doentes, com 25-

50% de casos pediátricos. 90% dos doentes com autoanticorpos anti-CFH têm uma deficiência completa de CFHR1 (proteína relacionada ao fator H do complemento 1) e CFHR3 associada a deleção homozigótica, um polimorfismo também observado em 4% de caucasianos saudáveis. Em estudos recentes, alguns doentes com SHUa e deficiência no CFHR1, originada em mutações no CFHR1 ou devido a deleção em CFHR1 e CFHR4, desenvolveram autoanticorpos anti-CFH. Estes dados sugerem que a deficiência isolada de CFHR1 é o fator predisponente para o desenvolvimento de autoanticorpos. Os níveis plasmáticos de C3 estão diminuídos em 40-60% dos doentes (9). O risco de progressão para IRT é 30-40% (27).

Mutações combinadas

Cerca de 12% de doentes apresentam várias combinações de 2 ou mais mutações de CFH, CFI, MCP, C3, CFB ou THBD (8), ou mutações num gene do complemento em conjunção com autoanticorpos anti-CFH. Salienta-se que somente 8-10% de doentes com CFH, C3 ou CFB têm anormalidades noutros genes, sugerindo que mutações em CFH, C3 ou CFB isoladas podem ser suficientes para causar SHUa. Em contraste, 25% de doentes com mutação em MCP ou CFI apresentam uma segunda ou terceira mutação noutros genes do complemento (9).

Penetrância incompleta

As mutações nos genes do complemento podem ser encontradas em familiares saudáveis de doentes com SHUa. A penetrância incompleta foi relatada em aproximadamente 50% de casos, em doentes com mutações no CFH, CFI, MCP, CFB e C3. Portanto, pode ser concluído que os fatores genéticos são importantes, mas não são suficientes para o desenvolvimento de SHUa, sugerindo um estímulo desencadeante para a doença se manifestar. Os eventos precipitantes, mais comumente infecções na via aérea superior ou gastroenterite, têm sido demonstradas em metade dos doentes. Embora a associação de diarreia com STEC-SHU esteja bem estabelecida, este sintoma também está presente na SHUa em 24 % de doentes. No entanto, ainda não está esclarecido se o episódio de diarreia age como precipitante ou é uma consequência de MAT. A gravidez é um precipitante comum, com cerca de 20% de mulheres a manifestar SHUa, 80% no período pós-parto. Logo, é provável que a SHUa resulte de um estímulo que ativa a via alternativa do complemento, a qual não pode ser controlada adequadamente em indivíduos com suscetibilidade genética (9).

7. ECULIZUMAB, PTT E SHU

O Eculizumab é um anticorpo humanizado monoclonal IgG, que tem como alvo o C5, bloqueando a ativação de C5, prevenindo a formação do complexo lítico C5b-C9 (8, 32). A ativação de C5 é essencial para o desenvolvimento de SHUa. O Eculizumab demonstrou a sua eficácia na SHUa, ao inibir o processo hemolítico e normalizar a função renal. É também benéfico, em doentes com SHUa mediada por autoanticorpos anti-CFH. Desde 2011, encontra-se licenciado para o tratamento pediátrico e em adultos, nos Estados Unidos, Europa e Canadá. Contudo, o bloqueio da via terminal do complemento predispõe para infeções meningocócicas, estando descritas infeções invasivas apesar da vacinação. Deve ser efetuada vacinação contra *Neisseria meningitidis*, duas semanas antes do início do tratamento (32,33). (Figura 6)

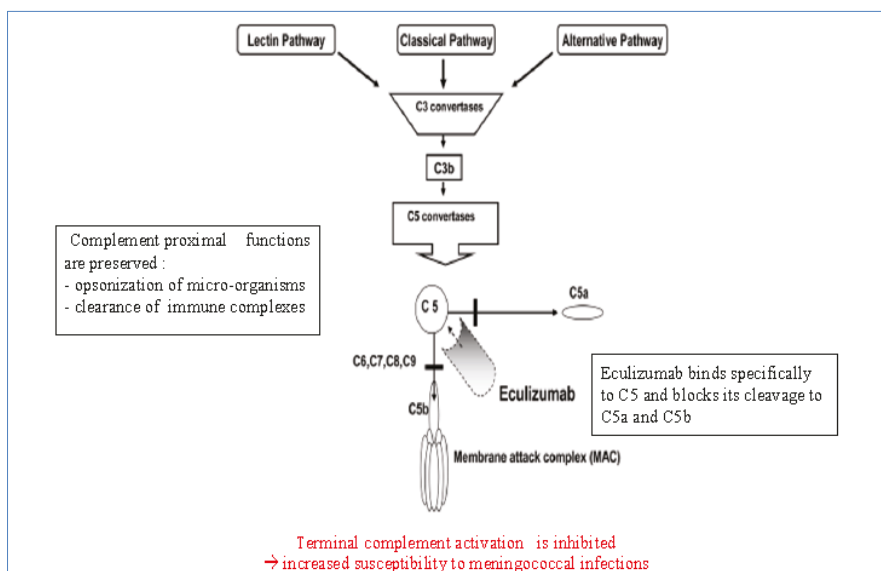


Figura 6. Bloqueio da via terminal do complemento. Eculizumab liga-se a C5 e previne a formação de MAC, reduzindo a clivagem de C5 a C5a e C5b. Adaptado de (8)

A evidência de ativação descontrolada do complemento na STEC-SHU, como fator promotor de lesão microangiopática, serviu como racional para a utilização de Eculizumab em três crianças com envolvimento neurológico, as quais recuperaram totalmente. No entanto, a sua utilização durante o surto na Alemanha em 2011, não apresentou resultados positivos na evolução clínica dos doentes. Em contraste, em França na epidemia causada por *E. coli* O104:H4, os doentes tratados com Eculizumab tiveram uma evolução favorável, com rápida normalização dos parâmetros hematológicos, melhoria na função renal e neurológica (6,9,34). Estas diferenças podem ser explicadas pela administração tardia no curso da doença, dado que nos doentes em progressão rápida

e envolvimento múltiplo de órgãos, parece apresentar menor eficácia (35). São necessários estudos adicionais para determinar a eficácia, população-alvo, duração e a altura de início de tratamento com Eculizumab (6).

A excessiva ativação na via alternativa do complemento foi evidenciada em doentes com PTT, indicando a presença conjunta de deficiência na ADAMTS13 e regulação no complemento. Nesta perspectiva um caso de PTT congénita foi tratado com sucesso pelo Eculizumab, no qual não foram identificadas mutações nos genes do complemento ou autoanticorpos (24,36). Existe outro caso na literatura sobre PTT adquirida, refratária, igualmente tratada com sucesso pelo Eculizumab. Contudo, neste doente verificou-se um polimorfismo no gene do CFH, que poderia explicar a resposta à terapêutica (31,36). Foi também descrito, um caso refratário de PTT adquirida com autoanticorpos anti-ADAMTS13, tratado com sucesso pelo Eculizumab, no qual foram posteriormente identificados autoanticorpos anti-CFH (37). A evidência de ativação do complemento, na patogénese da PTT, sugere um papel para a utilização de fármacos dirigidos ao complemento (36).

8. CONCLUSÃO

A PTT, STEC-SHU e SHUa são patologicamente indistinguíveis, no entanto, apresentam diferentes mecanismos fisiopatológicos, respetivamente, deficiência de ADAMTS13, infeção por microorganismos produtores de shigatoxina e desregulação da via alternativa do complemento. Contudo, através de estudos realizados, foi evidenciada ativação do complemento nestas três entidades, demonstrando um via comum na sua patogénese. O Eculizumab é um anticorpo monoclonal que tem como alvo C5, aprovado para a SHUa. Em alguns casos de STEC-SHU e PTT, o Eculizumab foi utilizado com sucesso. É necessária, portanto, maior investigação nesta área, que pode fornecer uma nova opção terapêutica em casos de PTT e STEC-SHU refratárias ao tratamento convencional.

9. AGRADECIMENTOS

À orientadora deste trabalho, Dr.^a Graça Vasconcelos Esteves, pela sua orientação, disponibilidade e apoio demonstrado.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Shenkman B, Einav Y. (2014) Thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathic hemolytic anemias: diagnosis and classification. *Autoimmun Rev.* 13(4-5):584–586.
2. Noris M, Mescia F, Remuzzi G. (2012) STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol.* 8(11):622–633.
3. Meri S. (2013) Complement activation in diseases presenting with thrombotic microangiopathy. *Eur J Intern Med.* 24(6):496–502.
4. Tonaco LC, Rios DRA, Vieira LM, Carvalho M das G, Dusse LMS. (2010) Púrpura trombocitopênica trombótica: o papel do fator von Willebrand e da ADAMTS13. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 32(2):155–161.
5. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, et al. (2012) Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol.* 158(3):323–335.
6. Picard C, Burtey S, Bornet C, Curti C, Montana M, Vanelle P. (2015) Pathophysiology and treatment of typical and atypical hemolytic uremic syndrome. *Pathol Biol (Paris).* 63(3):136–143.
7. Joseph C, Gattineni (2013) J. Complement disorders and hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Pediatr.* 25(2):209–215.
8. Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. (2011) Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 6:60.
9. Mele C, Remuzzi G, Noris M. (2014) Hemolytic uremic syndrome. *Semin Immunopathol.* 36(4):399–420.
10. Blombery P, Scully M. (2014) Management of thrombotic thrombocytopenic purpura: current perspectives. *J Blood Med.* 5:15–23.
11. Zheng XL, Hanby HA. (2014) Current Status in Diagnosis and Treatment of Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Hereditary Genet.* 3(1):e108 .
12. Said A, Haddad RY, Stein R, Lerma E V. (2014) Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Dis Mon.* 60(10):500–504.
13. Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y. (2012) Paradigm shift of childhood thrombotic thrombocytopenic purpura with severe ADAMTS13 deficiency. *Presse Med.* 41(3):e137–55.
14. Tsai H-M. (2010) Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* 91(1):1–19.

15. Lotta LA, Wu HM, Musallam KM, Peyvandi F. (2013) The emerging concept of residual ADAMTS13 activity in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Rev.* 27(2):71–76.
16. Lotta LA, Wu HM, Mackie IJ, Noris M, Veyradier A, Scully MA, et al. (2012) Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 120(2):440–448.
17. Crawley JTB, Scully MA. (2013) Thrombotic thrombocytopenic purpura: basic pathophysiology and therapeutic strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013:292–299.
18. Go RS, Winters JL, Leung N, Murray DL, Willrich MA, Abraham RS, et al. (2016) Thrombotic Microangiopathy Care Pathway: Consensus Statement for the Mayo Clinic Complement Alternative Pathway-Thrombotic Microangiopathy (CAP-TMA) Disease Oriented Group. *Mayo Clinic Proc.* 91(9):1189-1211.
19. Thomas MR, de Groot R, Scully MA, Crawley JTB. (2015) Pathogenicity of Anti-ADAMTS13 Autoantibodies in Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *EBioMedicine.* 2(8):942–952.
20. Vieira-Martins P, El Sissy C, Bordereau P, Gruber A, Rosain J, Fremeaux-Bacchi V. (2016) Defining the genetics of thrombotic microangiopathies. *Transfus Apher Sci.* 54(2):212–219.
21. Mannucci PM, Franchini M. (2012) Advantages and limits of ADAMTS13 testing in the prognostic assessment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Presse Med.* 41(3):e157–162.
22. Wu TC, Yang S, Haven S, Holers VM, Lundberg AS, Wu H, et al. (2013) Complement Activation and Mortality During an Acute Episode of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *J Thromb Haemost.* 11(10):1925–1927.
23. Turner N, Nolasco L, Nolasco J, Sartain S, Moake J. (2014) Thrombotic Microangiopathies and the Linkage between von Willebrand Factor and the Alternative Complement Pathway. *Semin Thromb Hemost.* 40(5):544–550.
24. Pecoraro C, Ferretti AV, Rurali E, Galbusera M, Noris M, Remuzzi G. (2015) Treatment of Congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura With Eculizumab. *Am J Kidney Dis.* 66(6):1067-70.
25. Feng S, Liang X, Kroll MH, Chung DW, Afshar-Kharghan V. (2015) von Willebrand factor is a cofactor in complement regulation. *Blood.* 125(6):1034-1037.

26. Tati R, Kristoffersson A-C, Ståhl A-L, Rebetz J, Wang L, Licht C, et al. (2013) Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency in human and murine thrombotic microangiopathy. *J Immunol.* 191(5):2184–2193.
27. Canpolat N. (2015) Hemolytic uremic syndrome. *Turk Pediatri Ars.* 50(2):73–82.
28. Keir LS, Saleem MA. (2014) Current evidence for the role of complement in the pathogenesis of Shiga toxin haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 29(10):1895–1902.
29. Brady TM, Pruetz C, Loeffler LF, et al. (2016) Typical HUS: Evidence of acute phase complement activation from a daycare outbreak. *J. Clin Exp.* 1(2):11.
30. Scully M, Goodship T. (2014) How I treat thrombotic thrombocytopenic purpura and atypical haemolytic uraemic syndrome. *Br J Haematol.* 164(6):759–766.
31. Chapin J, Weksler B, Magro C, Laurence J. (2012) Eculizumab in the treatment of refractory idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 157(6):772–774.
32. Zhang K, Lu Y, Harley KT, Tran MH. (2017) Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Brief Review. *Hematol Rep.* 9(2):7053.
33. Keating GM. (2013) Eculizumab: a review of its use in atypical haemolytic uraemic syndrome. *Drugs.* 73(18):2053-66.
34. Lapeyraque AL, Malina M, Fremeaux-Bacchi V, Boppel T, Kirschfink M, Oualha M, Proulx F, Clermont MJ, Le Deist F, Niaudet P, Schaefer F. (2011) Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med.* 364(26):2561-3.
35. Pape L, Hartmann H, Bange FC, Suerbaum S, Bueltmann E, Ahlenstiel-Grunow T. (2015) Eculizumab in Typical Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) With Neurological Involvement. *Medicine (Baltimore).* 94(24):e1000.
36. Sasapu A, Cottler-Fox M, Motwani P. (2017) Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura and atypical hemolytic syndrome successfully treated with eculizumab. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 30(2):182-183.
37. Tsai E, Zhou W, Chapin J, Laurence J, Tsai HM. (2013) Use of Eculizumab in the treatment of a case of refractory ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: additional data and clinical follow-up. *Br J Haematol.* 162(4):558-559.